



(51) 国際特許分類 C07D 493/10, A61K 31/35, C12P 17/18 // (C12P 17/18, C12R 1:465)	A1	(11) 国際公開番号 WO99/60000  (43) 国際公開日 1999年11月25日(25.11.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02288  (22) 国際出願日 1999年4月28日(28.04.99)  (30) 優先権データ 特願平10/135205 1998年5月18日(18.05.98)  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) メルシヤン株式会社(MERCIAN CORPORATION)[JP/JP] 〒104-8305 東京都中央区京橋一丁目5番8号 Tokyo, (JP) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 若林利明(WAKABAYASHI, Toshiaki)[JP/JP] 〒305-0042 茨城県つくば市下広岡668-36 Ibaraki, (JP) 川瀬礼奈(KAWASE, Rena)[JP/JP] 〒316-0032 茨城県日立市西成沢町1-32-2-301 Ibaraki, (JP) 成瀬庸彰(NARUSE, Nobuaki)[JP/JP] 〒300-1222 茨城県牛久市南7-55-5 Ibaraki, (JP) 藤田雅宣(FUJITA, Masanori)[JP/JP] 〒305-0032 茨城県つくば市竹園2-15-1-505 Ibaraki, (JP) 鮫島朋宏(SAMESHIMA, Tomohiro)[JP/JP] 〒251-0004 神奈川県藤沢市藤が岡2-1-30-306 Kanagawa, (JP) 渡辺吉雄(WATANABE, Yoshio)[JP/JP] 〒251-0004 神奈川県藤沢市藤が岡2-22-3 Kanagawa, (JP)		土橋和之(DOBASHI, Kazuyuki)[JP/JP] 〒257-0013 神奈川県秦野市南が丘3-4-1 エクシー ド5-204 Kanagawa, (JP) 船橋泰博(FUNAHASHI, Yasuhiro)[JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日3-5-1-304 Ibaraki, (JP) 仙波太郎(SENBA, Taro)[JP/JP] 〒305-0024 茨城県つくば市倉掛851-1-202 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

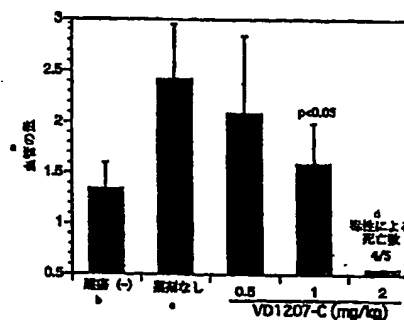
(54) 発明の名称 新生理活性物質

(57) Abstract

Novel physiologically active substances having a neovascularization inhibitory effect. Compounds represented by general formula (1) or salts thereof are isolated from a liquid culture medium of a strain belonging to the genus *Streptomyces* and the structures are analyzed. In said formula, R<sup>1</sup> represents hydrogen, aldehyde or lower acyl; R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> may be the same or different and each represents hydrogen or lower alkoxy, or R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> may represent together oxygen; R<sup>4</sup> represents lower alkyl; and R<sup>5</sup> represents hydrogen or lower alkyl, provided that the case where R<sup>1</sup> is aldehyde, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> are different from each other and represent hydrogen or methoxy, R<sup>4</sup> is ethyl and R<sup>5</sup> is hydrogen is excluded.

NEWLY FORMED BLOOD VESSEL UNDER ADMINISTRATION OF VD1207C

VD1207C の各投与量において新生された血管の量

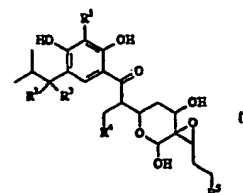


a ... AMOUNT OF BLOOD VESSEL

b ... TUMOR (-)

c ... NO DRUG

d ... CASE OF DEATH DUE TO TOXICITY

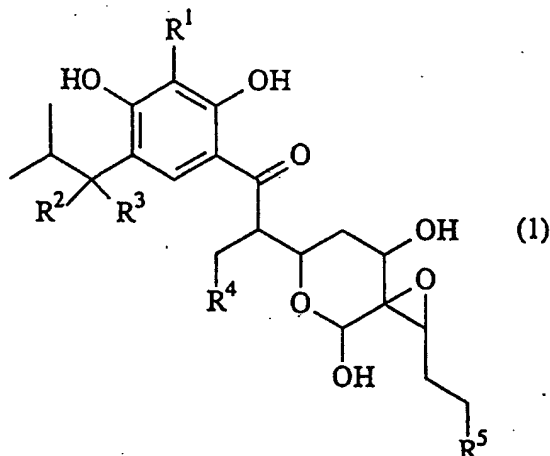


BEST AVAILABLE COPY

# (57)要約

本発明は、血管新生抑制作用を有する新規生理活性物質を提供する。

ストレプトミセス族菌種の培養液より、式(1)で表わされる化合物又はその塩を単離し構造解析した。



(式中、R<sup>1</sup>は水素原子、アルデヒド基又は低級アシル基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は同一又は相異なり水素原子もしくは低級アルコキシ基、又は一緒になって酸素原子を意味し、R<sup>4</sup>は低級アルキル基、R<sup>5</sup>は水素原子又は低級アルキル基を意味する。但し、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が相異なり水素原子又はメトキシ基、R<sup>4</sup>がエチル基で、かつR<sup>5</sup>が水素原子である化合物は除く。)

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CN カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CR 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CU コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CY キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CZ チェコ	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
DE ドイツ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DK デンマーク	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

## 新生理活性物質

## 発明の属する技術分野

本発明は血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防及び治療に有効な新規生理活性物質に関する。

## 従来技術

血管新生は胎児期の血管樹形成や各臓器の形態的、機能的発達時に不可欠な生物学的現象である。新生血管は内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成などの複数の過程を経て構築され、その過程にはマスト細胞、リンパ球、間質細胞などの関与も重要であることが報告されている (J. Folkman and Y. Shing, J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992)。成熟個体では女性性周期においてのみに血管新生が生じるが、成熟個体においては血管新生の病的増加が様々な疾患の発症あるいは進行過程に関与していることが知られている。具体的には癌、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどが血管新生の異常を伴う疾患としてあげられる (J. Folkman, N. Engl. J. Med., 333, 1757, 1995)。

特に固形癌の増殖は血管新生に依存する事が報告されており、血管新生阻害剤が難治性固形癌に対する新しい治療薬になると期待されている (Folkman J., J. Natl. Cancer Inst., 82, 4, 1990)。

また、リウマチ性関節炎では浸潤したマクロファージ・リンパ系細胞からの血管新生因子の過剰な産生が関節内の血管新生誘導に関与すると言われ (Kahn J., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 12, 50, abstract, 1993)、コラーゲン関節炎モデルで血管新生阻害剤 AGM-470が関節炎を抑制することが示された。 (Peacock DJ., J. Exp. Med. 175, 1135-8, 1992)。これにより、炎症性疾患において血管新生を抑制することが、疾患の治療にもつながることが示唆された。

アテローム性動脈硬化症では、低酸素で誘導される vascular endothelial

growth factor (VEGF) の過剰産生によりアテローム斑での血管新生が引き起こされることが示され (Stavri GT., FEBS Lett., 358, 311-5, 1995)、腫瘍増殖に血管新生が必要であると同様に、アテローム斑の伸展にも血管新生が必要であると言われている (O'Brien ER., Am. J. Pathol., 146, 1029-39, 1994)。また、時に新生児の生死に関わることがある血管腫では、血管新生抑制活性の知られている IFN- $\alpha$ 2a による治療が試みられている (White CW., N. Engl. J. Med. 320, 1197-200, 1989)。これら疾患に対する治療薬として、新たな血管新生抑制剤が待望されている。

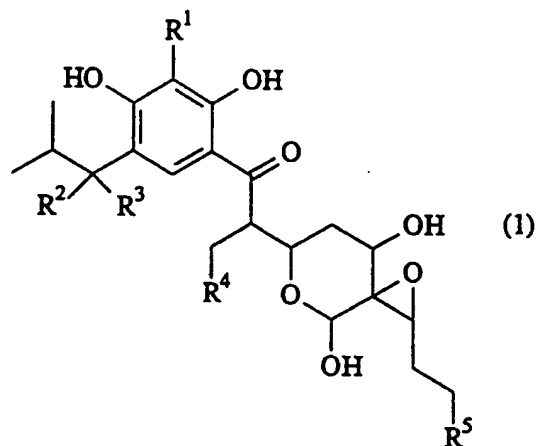
これまでいくつかの血管新生阻害物質に関する報告はあるが、いまだに実用化に耐える有効な物質は見出されていない (公開特許公報平3-109324号、公開特許公報平3-236324号、公開特許公報平3-2148号)。

本発明は血管新生阻害活性を有する新規物質を単離し、血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防及び治療剤を提供することにある。

#### 発明の開示

上記現状に鑑み、本発明者らは微生物培養液を原料として、血管新生阻害物質の探索スクリーニングを行った。その結果、ストレプトミセス属に属する微生物の培養液中に血管新生阻害物質が産生されることを見出した。この活性物質を単離・構造決定したところ新規活性物質であることが判明した。そして、その作用メカニズムを解析した結果、阻害作用メカニズムの一つとして内皮細胞に対する接着分子発現抑制作用も有することを見出した。具体的には内皮細胞の VCAM-1 と E-selectin の発現に対して本物質は明らかな阻害作用を示した。VCAM-1 及び E-selectin は血管新生に必要な内皮細胞の遊走や管腔形成に関与していることが示唆されているが (A. E. Koch et al, Nature, 376, 517, 1995)、内皮細胞とリンパ球との接着にも関与していることが報告されている。従って、本物質は血管新生に起因する疾患に加え、活性化リンパ球による異常反応に起因すると考えられる種々の疾病、具体的には膠原病や移植拒絶反応などの自己免疫、心筋梗塞、動脈硬化症等の疾患に対する治療薬となる事が期待される。

すなわち本発明は、一般式（１）で表わされる化合物、その塩又はその水和物に関する。



（式中、R<sup>1</sup>は水素原子、アルデヒド基又は低級アシル基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は同一又は相異なり水素原子もしくは低級アルコキシ基、又は一緒になって酸素原子を意味し、R<sup>4</sup>は低級アルキル基、R<sup>5</sup>は水素原子又は低級アルキル基を意味する。但し、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が相異なり水素原子又はメトキシ基、R<sup>4</sup>がエチル基で、かつR<sup>5</sup>が水素原子である化合物は除く。）

より具体的にはそれぞれ、

一般式（１）において、R<sup>1</sup>が水素原子、アルデヒド基又はアセチル基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一又は相異なり水素原子もしくはメトキシ基、又は一緒になって酸素原子、R<sup>4</sup>がエチル基、ノルマルプロピル基又はイソプロピル基、R<sup>5</sup>が水素原子又はメチル基である化合物（但し、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が相異なり水素原子又はメトキシ基、R<sup>4</sup>がエチル基で、かつR<sup>5</sup>が水素原子である化合物は除く。）、その塩又はその水和物、

一般式（１）において、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一で水素原子、R<sup>4</sup>がエチル基、R<sup>5</sup>が水素原子又はメチル基である化合物、その塩又はその水和物、

一般式（１）において、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一で水素原子、R<sup>4</sup>がノルマルプロピル基又はイソプロピル基、R<sup>5</sup>が水素原子である化合物、その塩又はその水和物、

一般式(1)において、 $R^1$ がアルデヒド基、 $R^2$ 及び $R^3$ が相異なり水素原子又はメトキシ基、 $R^4$ がノルマルプロピル基又はイソプロピル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物、

一般式(1)において、 $R^1$ が水素原子、 $R^2$ 及び $R^3$ が一緒になって酸素原子、 $R^4$ がエチル基又はイソプロピル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物、

一般式(1)において、 $R^1$ がアセチル基、 $R^2$ 及び $R^3$ が同一で水素原子、 $R^4$ がエチル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物、

これらの化合物、あるいは一般式(1)において、 $R^1$ がアルデヒド基、 $R^2$ 及び $R^3$ が相異なり水素原子又はメトキシ基、 $R^4$ がエチル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする医薬、

ストレプトミセス・エスピー・エムイーアール・ヴィディ1207 (*Streptomyces* sp. Mer-YD1207, FERM P-15889) を栄養培地中で培養し、その培養液から上記の化合物又はその塩を採取する事の特徴とする、上記化合物又はその塩の製造方法に関する。

本発明は、上記の化合物、その塩又はその水和物を薬理上有効量及び薬理上許容できる担体を含む医薬組成物、上記の化合物、その塩又はその水和物の薬理上有効量を患者に投与し、血管新生阻害活性または接着分子VCAM-1又は/及びE-selectin発現抑制活性が有効な疾患を治療する方法または上記の化合物、その塩又はその水和物の、血管新生阻害活性または接着分子VCAM-1又は/及びE-selectin発現抑制活性が有効な疾患の治療剤を製造する用途を提供する。

本発明は、リウマチ性関節炎、固形癌、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどに対する予防剤及び治療薬を提供する。

#### 発明の詳細な説明

本発明化合物の精製原料として、ストレプトミセス属の菌種いずれも使用可能であると期待されるが、本発明の代表的な菌株として、熊本県で採取された土壌より分離された放線菌で、本発明者らがエムイーアール・ヴィディ1207 (Mer-YD

1207) 菌株と番号を付した菌株が挙げられる。このエムイーアール・ヴィディ1207菌株の菌学的性状は次の通りであった。

培養はすべて28℃で行った。培地はインターナショナル・ストレプトミセス・プロジェクト・コミッティー (International Streptomyces Project Committee) (以後ISP という) が推奨するものから選択した。色調の記載はコンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル (Container Corporation of America の Color Harmony Manual) の ( ) 内に示す符号で示した。

### (1) 形態

菌株の顕微鏡検査によると、基生菌糸はよく伸長し、同じくよく伸長する気中菌糸を着生した。気中菌糸の先端は断裂して円筒形の胞子となった。胞子の大きさは直径  $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$  で胞子表面はsmoothであった。胞子は10個から50個が連鎖した直線状の胞子鎖となった。

### (2) 各種培地上での生育

ISP-2 培地；生育は良好で、薄い気中菌糸の上に赤色系の胞子をつけた。コロニー裏側は褐色で、培地中に黄褐色～褐色の可溶性色素を出した。

ISP-3 培地；生育は弱く、白色の気中菌糸を僅かに産生した。コロニー裏側は褐色であった。

ISP-4 培地；生育は良好で、豊富な気中菌糸の上に赤色系 (5dc; Grayish yellowish pink) の胞子をつけた。コロニー裏側は黄褐色であった。

ISP-5 培地；生育は中程度で、薄い気中菌糸の上に赤色系の胞子をつける。コロニー裏側は褐色で、培地中に黄褐色～褐色の可溶性色素を出した。

ISP-7 培地；メラニン色素を産生していた (培地黒変)。

また、産生した可溶性色素はpHによって変色しなかった。

### (3) 糖の資化性

本菌株の菌体をISP-9 培地に各種糖を加えた寒天培地に塗抹し、3～10日間培養して、その生育状況を観察した。グルコース、フラクトース、ラムノース、シュクロース、イノシトール、マンノース、アラビノース、キシロースをよく資化

した。

#### (4) 菌体成分分析

本菌株の菌体を6N HClで一夜加水分解し、その濃縮物をセルロースTLCで分離し、ジアミノピメリン酸標準物質と比較して異性体型を確認した。得られたジアミノピメリン酸の異性体型はLL型であった。

以上の菌学的性質から本菌はストレプトミセス (*Streptomyces*) 属の菌であることは明確である。本発明者らは、本菌をストレプトミセス・エスピー・エムイー・アール・ヴィディー1207 (*Streptomyces* sp. Mer-VD1207) として工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に FERM P-15889 の番号で1996年9月27日に寄託した。又、これは1999年4月5日に国際寄託番号 FERM BP-6693で移管した。

#### 生産菌の培養

上記微生物の培養方法は、原則的には一般微生物の培養法に準ずるが、通常は通気攪拌培養法などの好氣的条件下で行なうのが好適である。培養に用いられる培地としては、ストレプトミセス属に属する微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成培地、半合成培地、天然培地などいずれも用いることができる。培地組成としては炭素源としてのグルコース、シュクロース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、澱粉、糖蜜、コーン・スティープ・リカー、有機酸などを単独又は組み合わせて用い得る。窒素源としてはファーマメディア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、尿素などの有機窒素源、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機窒素源を単独又は組み合わせて用い得る。ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、その他の重金属塩なども必要に応じて添加使用され得る。なお、培養中発泡の著しいときは公知の各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできるが、その添加は目的物質の生産に悪影響をあたえないものとする必要がある。

培地のpHは微生物の至適pH範囲、通常中性付近とするのが望ましい。培養温度は、微生物が良好に生育する温度、通常20～40℃、特に好ましくは30℃付近に保つのがよい。培養時間は液体培養の場合、1～5日間程度とされる。もちろん上



述した各種の培養条件は、使用微生物の種類や特性、外部条件などに応じて適宜変更でき、またそれぞれに応じて上記範囲から最適条件を選択、調節される。

血管新生阻害活性のスクリーニング法として、ラット大動脈片をコラーゲンゲル内にて培養した場合に観察される管腔形成の阻害度を指標とした (Nicosia R. F., Lab. Invest., 63, 115, 1990)。又、得られた化合物についてその血管新生阻害活性の作用機構解析を目的として、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞を用いる内皮細胞増殖抑制作用、及び内皮細胞に対する接着分子発現抑制作用について測定した。

菌の培養液からの本発明化合物の精製は以下のようにして精製することができる。ストレプトミセス属の微生物を通常の適切な培養条件にて培養後、培養液を清澄濾過したのちブタノール又はメチルイソブチルケトンなどの有機溶媒を加え抽出し、有機溶媒層を減圧下濃縮する。次いでメタノールにて抽出し、石油エーテル (light petroleum) などで処理し粗抽出物を得る。次いでシリカゲルなどを用いる吸着クロマトグラフィー、LH 20 ゲルクロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどを適宜利用して分画し、活性スクリーニングにより活性画分を確認する。上記手法を適宜組み合わせることにより活性物質を単離することができる。吸着クロマトグラフィーに使用する溶媒としては、クロロホルム、メタノール、アセトン、ヘキサン、トルエンなど通常使用される有機溶媒を用い、適宜濃度を選択、組み合わせで使用することができる。結晶化の溶媒としてはクロロホルムとヘキサン、又はクロロホルムと四塩化炭素などを用いることができる。一つの手法として M. Lumbr らの方法がある (Nature, 206, 263, 1965)。単離した化合物の構造解析は、元素分析、GC-MS、NMR、融点など常法の手法によって行うことができる。

単離した化合物は強力な血管新生阻害活性を有することを見い出した。前記の如く、各種疾患において異常な血管新生が観察されていることから、それら疾患、例えばリウマチ性関節炎、固形癌、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどの予防剤として、また治療薬として期待されるものであり、特に抗固形癌剤として有効である。

該化合物を各種疾患治療・予防剤として投与する場合、錠剤、散剤、顆粒剤、

カプセル剤、シロップ剤などとして経口的に投与してもよいし、また噴霧剤、坐剤、注射剤、外用剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は症状の程度、年齢、肝疾患の種類などにより著しく異なるが、通常成人1日当たり約1 mg～100mg を1日1～数回にわけて投与する。

製剤化の際は通常の製剤担体を用い、常法により製造する。すなわち、経口用固形製剤を調製する場合は、主薬に賦形剤、更に必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などとする。これらの錠剤、顆粒剤には糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コーティングすることは勿論差し支えない。

注射剤を調製する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤とする。

#### 図面の簡単な説明

図1は、VD1207Cの各投与量において新生された血管の量を示した図である。

図2は、VD1207B, C, D, E, F, G2の1 mg/kg, 2 mg/kgを4日間にわたり腹腔内へ連投した際の体重変化を示した図である。

#### 実施例

以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### 実施例1 精製方法

*Streptomyces* sp. VD1207株の斜面培養(ISP-2寒天培地)から1白金耳を100mlの種培地(グリセロール2%、グルコース2%、大豆粉2%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.25%、CaCO<sub>3</sub> 0.32%、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 0.0005%、MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O 0.0005%、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.0005%)を入れた500ml容の三角フラスコに接種した。これを28℃で2日間回転攪拌機上で培養して一次種培養液を得た。この一次種培養液5mlを上記と同じ組成の培地500mlを含む3L容坂口フラスコに接種して、28℃で48時間往復式攪拌機上で培養を行って二次種培養液を得た。この二次種培養液1L

づつを上記と同じ組成の培地 100L を含む 200L 容培養タンク 2 基に接種して、28℃で64時間通気攪拌培養（通気量50L/ml、攪拌185-325r.p.m.）を行った。

得られた全培養液200Lを連続遠心分離器にかけ、上清と菌体とに分離した。上清をダイヤイオンHP-20 20Lのカラムに通過させ、20%メタノール60Lで洗浄した。続いて、80%アセトン60Lで溶出し、溶出液を減圧下で濃縮し、アセトンを留去した。残った水溶液を、酢酸エチル5Lで2回抽出し、酢酸エチル層を減圧下濃縮乾固して19gの粗抽出物を得た。

また、菌体を100Lのメタノールで抽出し、得られたメタノール抽出物を、減圧下で濃縮し、メタノールを留去した。残った水溶液を、酢酸エチル12Lで2回抽出した。得られた抽出液を減圧下濃縮乾固して74gの粗抽出物を得た。

上清と菌体からの抽出物をあわせ、少量のジメチルスルホキシドに溶解し、アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）=4:6の混合溶液で予め平衡化しておいたYMC-GEL ODS-AM 120-S50（ワイエムシ社製）のカラム（内径50mm、長さ950mm）に二度に分けて付した。同じ組成の混合溶媒、1:1の組成の混合溶媒、55:45の組成の混合溶媒で洗浄した。続いて、6:4の組成の混合溶媒、65:35の組成の混合溶媒、7:3の組成の混合溶媒で順次極性を下げて、溶出した。溶出液は高速液体クロマトグラフで分析し、VD1207 U1, U2, A1, A2, B, C, D, E, F, F', G1, G2, G', H（カラム：J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm、ワイエムシ社製、移動層：アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）=6:4、流速：1mL/min、検出：254nmにおける紫外吸収、保持時間；U1, U2:3.7min、A1, A2:4.8min、B:5.4min、C:6.0min、D:7.0min、E:7.4min、F:8.0min、F':8.2min、G1, G2:9.4min、G':9.8min、H:10.3min）の各成分を含む溶出液をそれぞれ集め、U1, U2成分を含むフラクション、A1, A2成分を含むフラクション、B成分を含むフラクション、C成分を含むフラクション、D成分を含むフラクション、E成分を含むフラクション、F成分を含むフラクション、F'成分を含むフラクション、G1, G2, G'成分を含むフラクション、H成分を含むフラクションをそれぞれ得た。各フラクションはアセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

## 実施例 2 VD1207U1, U2の精製及び構造解析

実施例1 で得られたU1, U2 成分を含むフラクションを酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル (Silica Gel FL100D、富士シリシア化学社製) を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム (内径20mm、長さ500mm) に付した。ヘキサン-アセトン=90:10の混合溶媒で洗浄し、85:15の混合溶媒で溶出した。U1, U2 成分を含む溶出液をあわせ、濃縮乾固した。

このものを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC (カラム: J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5)=55:45、流速: 12mL/min、検出: 254nm) における紫外吸収、保持時間: U1: 26.2分、U2: 27.1分) に付した。この分取をくりかえし、U1, U2 成分のピークを示す溶出液をそれぞれ併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207 U1, U2の純粋な白色粉末をそれぞれ57mg、132mg得た。

### VD1207U1構造解析データ

1. 色及び性状: 白色粉末

2. 分子式:  $C_{23}H_{33}O_8$

3. マススペクトル (FAB-MS):  $m/z$  437 (M+H)<sup>+</sup>

4. 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25}$  +2.5 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外吸収スペクトル:

中性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ): 257 (23700), 324 (3100)

酸性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ): 257 (25000), 324 (3200)

塩基性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ): 260 (10300), 317 (9700), 344 (8900)

6. 赤外部吸収スペクトル:

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $cm^{-1}$ )

3440, 2970, 2880, 1640, 1590, 1490, 1460, 1390, 1350, 1210, 1160,

1090, 1040, 970, 930, 900, 830, 740, 670, 590, 460, 410

7. <sup>1</sup>H NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>1</sup>H-シフト (J値)

8.39 (1H, s), 6.43 (1H, s), 4.81 (1H, brs), 4.46 (1H, ddd, 11, 10, 1.5),  
4.27 (1H, ddd, 11, 6, 5), 3.30 (1H, t, 6, 5), 3.51 (1H, ddd, 10, 4, 3, 5),  
2.32 (1H, ddd, 12, 5, 1.5), 1.54 (1H, m), 3.59 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.61 (1H, m),  
3.59 (2H, m), 1.44 (2H, m), 1.29 (3H, m), 1.29 (3H, m), 1.30 (3H, t, 7, 5),  
1.06 (3H, d, 7, 5), 13.21 (1H, s), 13.18 (1H, s), 2.82 (1H, d, 2, 5), 1.68 (1H, d, 11),  
8. <sup>13</sup>C NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>13</sup>C-シフト

209.1 (s), 207.5 (s), 169.7 (s), 168.7 (s), 135.6 (d), 114.9 (s), 111.9 (s),  
105.1 (d), 94.0 (d), 70.2 (d), 62.5 (d), 61.9 (s), 59.8 (d), 50.0 (d), 37.3 (t),  
34.9 (t), 31.2 (t), 20.6 (t), 20.6 (t), 19.7 (q), 19.1 (q), 14.2 (q), 10.4 (q).

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 3.7min

11. 薄層クロマトグラフィー:

担体: シリカゲル60 F254 (メルク社製、ドイツ)

展開溶媒: ヘキサン / アセトン (7:3)

Rf値: 0.38.

VD1207U2構造解析データ

1. 色及び性状: 白色粉末

2. 分子式: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>

3. マススペクトル (FAB-MS): m/z 437 (M+H)<sup>+</sup>

4. 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25}$  -6.2 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外外部吸収スペクトル:

中性メタノール中:  $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ ): 257 (41700), 324 (5700)

酸性メタノール中:  $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ ): 257 (41900), 325 (5100)

塩基性メタノール中:  $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ ): 261 (18700), 316 (17300), 346 (16700)

6. 赤外部吸収スペクトル:

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数, cm<sup>-1</sup>)

3430, 2970, 2880, 1640, 1590, 1490, 1470, 1430, 1350, 1210, 1160,

1090, 1040, 990, 970, 930, 900, 830, 760, 680, 590, 540, 460

7. <sup>1</sup>H NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>1</sup>H-シフト (J値)

8.42 (1H, s), 6.46 (1H, s), 5.02 (1H, d, 3), 4.41 (1H, ddd, 11.8, 1.5),

4.22 (1H, ddd, 11.6, 5), 3.31 (1H, t, 6.5), 3.59 (1H, ddd, 10.4, 3.5),

2.05 (1H, ddd, 12.5, 1.5), 1.41 (1H, dd, 11, 12), 3.55 (1H, m), 1.85 (2H, m),

1.25 (2H, m), 1.63 (2H, m), 1.29 (3H), 1.29 (3H), 0.90 (3H, d, 7.5),

1.09 (3H, d, 7.5), 13.21 (1H, s), 13.17 (1H, s), 2.59 (1H, d, 3.5), 1.51 (1H, d, 12),

8. <sup>13</sup>C NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>13</sup>C-シフト

208.9 (s), 206.5 (s), 169.9 (s), 169.2 (s), 135.5 (d), 114.5 (s), 112.0 (s),

105.4 (d), 94.5 (d), 69.8 (d), 62.4 (d), 61.8 (s), 59.9 (d), 49.9 (d), 37.3 (d),

34.8 (d), 32.3 (t), 20.6 (t), 20.6 (t), 19.6 (q), 19.3 (q), 14.2 (q), 10.5 (q),

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：3.7min

1.1. 薄層クロマトグラフィー：

担体：シリカゲル60 F254（メルク社製、ドイツ）

展開溶媒：ヘキサン / アセトン（7:3）

Rf値：0.35.

実施例3 VD1207A1, A2の精製及び構造解析

実施例1で得られたA1, A2成分を含むフラクションに溶解し、分取HPLC（カラム：J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層：アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）=60:40、流速：10mL/min、検出：254nmにおける紫外吸収、保持時間：A1, A2：29.4分）に付した。この分取をくりかえし、A1, A2成分のピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート（シリカゲル60 No. 5744メルク社製）で展開溶媒（トルエン-メタノール=9:1）を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ（254nm）でA1, A2成分のスポットを確認し（Rf値：A1：0.23, A2：0.17）、それぞれの成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207 A1, A2の純粋な白色粉末をそれぞれ6mg, 11mg得た。

VD1207A1構造解析データ

1. 色及び性状：白色粉末

2. 分子式： $C_{24}H_{38}O_8$

3. マススペクトル（FAB-MS）： $m/z$ 451（M+H）<sup>+</sup>

4. 比旋光度： $[\alpha]^{25}_D$  +1.9（c 0.1, CHCl<sub>3</sub>）

5. 紫外外部吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：257(48900), 324(6900)

酸性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：257(54300), 324(7700)

塩基性メタノール中： $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ )：261(22100), 317(20700), 345(20100)

6. 赤外部吸収スペクトル：

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、 $\text{cm}^{-1}$ )

3440, 2960, 1640, 1590, 1490, 1470, 1390, 1350, 1210, 1160, 1090,  
1030, 980, 930, 830, 740, 670, 590, 460

7.  $^1\text{H}$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル $^1\text{H}$ -シフト(J値)

8.43(1H, s), 6.44(1H, s), 4.82(1H, brs), 4.39(1H, ddd, 11.5, 9.5, 2),  
4.27(1H, ddd, 12, 11.5, 5), 3.30(1H, dd, 7, 6), 3.58(1H, m),  
1.84(1H, ddd, 13.5, 11, 4), 1.33(1H, ddd, 13.5, 10, 3.5), 2.34(1H, ddd, 12.5, 2),  
1.53(1H, ddd, 12, 12, 11.5), 3.59(1H, sept, 7), 1.44(1H, m), 0.89(3H, d, 6.5),  
0.89(3H, d, 6.5), 1.63-1.52(2H, m), 1.28(3H, d, 7), 1.30(3H, d, 7), 1.06(3H,  
t, 7.5), 13.22(1H, s), 13.18(1H, brs), 2.49(1H, brs), 1.63(1H, d, 11.5)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル $^{13}\text{C}$ -シフト

209.1(s), 207.8(s), 169.7(s), 168.7(s), 135.7(d), 115.1(s), 111.9(s),  
105.1(d), 94.1(d), 71.0(d), 62.5(d), 61.8(s), 59.8(d), 48.3(d), 38.4(t),  
37.5(t), 34.9(d), 26.0(d), 23.8(q), 21.9(q), 20.6(t), 19.7(q), 19.1(q),  
10.5(q)

9. 溶解性：

可溶：酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶：中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm(ワイエムシイ社製)

溶媒：アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液(pH3.5)=6:4

流速：1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：4.8min



## 1 1. 薄層クロマトグラフィー:

担体: シリカゲル 60 F254 (メルク社製、ドイツ)

展開溶媒: トルエン / メタノール (9:1)

Rf値: 0.23.

## VD1207A2構造解析データ

## 1. 色及び性状: 白色粉末

2. 分子式:  $C_{24}H_{30}O_8$ 3. マススペクトル (FAB-MS):  $m/z$  451 (M+H)<sup>+</sup>4. 比旋光度:  $[\alpha]^{25}_D$  -6.2 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

## 5. 紫外吸収スペクトル:

中性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 258 (63900), 325 (9500)

酸性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 257 (63900), 325 (9400)

塩基性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 261 (25100), 317 (23400), 347 (25000)

## 6. 赤外吸収スペクトル:

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $cm^{-1}$ )

3440, 2960, 1640, 1590, 1490, 1470, 1350, 1210, 1160, 1090, 1040,  
970, 930, 900, 830, 730, 690, 590, 540, 460

7.  $^1H$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1H$ -シフト (J値)

8.46 (1H, s), 6.46 (1H, s), 5.01 (1H, d, 3), 4.34 (1H, ddd, 12.7, 1.5),  
4.21 (1H, ddd, 12.11.5, 4.5), 3.31 (1H, t, 6.5), 3.69 (1H, ddd, 10.5, 7.3, 5),  
1.91 (1H, ddd, 13.5, 10.5, 5), 1.66 (1H, m), 2.03 (1H, ddd, 12.4, 5, 1.5),  
1.45 (1H, ddd, 12, 12, 12), 3.57 (1H, sept, 7), 1.50 (1H, m), 0.91 (3H, d, 6.5)  
0.91 (3H, d, 6.5), 1.64 (2H, m), 1.29 (3H, d, 7), 1.30 (3H, d, 7), 1.10 (3H, t, 7.5),  
13.21 (1H, s), 13.21 (1H, s), 2.59 (1H, d, 3), 1.54 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}C$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}C$ -シフト

208.9 (s), 206.6 (s), 169.9 (s), 169.2 (s), 135.5 (d), 114.6 (s), 112.0 (s),

105.4 (d), 94.5 (d), 70.6 (d), 62.5 (d), 61.8 (s), 59.8 (d), 47.7 (d), 39.2 (t),  
37.1 (t), 34.8 (d), 26.1 (d), 23.7 (q), 22.0 (q), 20.6 (t), 19.6 (q), 19.2 (q),  
10.5 (q)

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 4.8min

11. 薄層クロマトグラフィー:

担体: シリカゲル60 F254 (メルク社製、ドイツ)

展開溶媒: トルエン / メタノール (9:1)

Rf値: 0.17.

実施例4 VD1207B精製及び構造解析

実施例1で得られたB成分を含むフラクションを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート(シリカゲル60 No. 13895メルク社製)で展開溶媒(ヘキサン-アセトン=7:3)を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ(254nm)でB成分のスポットを確認し、B成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート(シリカゲル60 No. 5744メルク社製)で展開溶媒(トルエン-メタノール=9:1)を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ(254nm)でB成分のスポットを確認し、B成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207Bの純粋な淡橙色粉末61mgを得た。

## VDI207B構造解析データ

1. 色及び性状：淡橙色粉末

2. 分子式： $C_{23}H_{30}O_9$

3. マススペクトル (FAB-MS) :  $m/z$  481 (M+H)<sup>+</sup>

4. 比旋光度： $[\alpha]_D^{25}$  -97.7 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 254(21300), 276(16800), 341(8500)

酸性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 253(27400), 276(19100), 353(7700)

塩基性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 278(18200), 332(24600)

6. 赤外吸収スペクトル：

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、cm<sup>-1</sup>)

3360, 2960, 1630, 1450, 1380, 1300, 1260, 1180, 1090, 1040, 930, 830,

750, 680, 590

7. <sup>1</sup>H NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>1</sup>H-シフト (J値)

10.42 (1H, s), 8.08 (1H, s), 4.97 (1H, d, 3), 4.33 (1H, d, 6), 4.40 (1H, ddd, 12, 7, 2),

4.19 (1H, ddd, 12, 12, 5), 3.28 (1H, t, 6, 5), 3.23 (3H, s), 3.61 (1H, m),

2.05 (1H, ddd, 12, 5, 2), 1.44 (1H, ddd, 12, 12, 12), 1.92 (1H, sept, d, 7, 7),

1.80 (2H, m), 1.64 (2H, qd, 7, 5, 6, 5), 1.28 (2H, m), 0.93 (3H, d, 6, 5), 0.93 (3H, d,

6, 5), 0.89 (3H, d, 7, 5), 1.08 (3H, t, 7, 5), 14.17 (1H, brs), 12.97 (1H, brs),

2.89 (1H, s), 1.56 (1H, d, 12)

8. <sup>13</sup>C NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル<sup>13</sup>C-シフト

207.2 (s), 194.4 (d), 167.9 (s), 167.3 (s), 137.6 (d), 120.3 (s), 113.0 (s),

109.2 (s), 94.5 (d), 80.6 (d), 69.6 (d), 62.6 (d), 61.8 (s), 59.7 (d), 57.2 (q),

49.8 (d), 37.1 (t), 33.8 (d), 33.9, 31.8 (t), 20.6 (t), 20.6 (t), 18.7 (q),

17.6 (q), 14.1 (q), 10.5 (q)

9. 溶解性：

可溶：酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶：中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm（ワイエムシイ社製）

溶媒：アセトニトリルー10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）＝6:4

流速：1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：5.4min.

実施例5 VDI207C精製及び構造解析

実施例1で得られたC成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC（カラム：J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動相：アセトニトリルー10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）＝6:4、流速：12mL/min、検出：254nmにおける紫外吸収、保持時間：31.3分）に付した。この分取をくりかえし、C成分の単一ピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル（Wakogel C-200、和光純薬工業社製）を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム（内径20mm、長さ500mm）に付した。ヘキサンーアセトン＝95:5の混合溶媒、90:10の混合溶媒で洗浄し、80:20の混合溶媒で溶出した。C成分を含む溶出液をあわせ、濃縮乾固した。

得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル（Wakogel C-200、和光純薬工業社製）を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム（内径20mm、長さ500mm）に付した。トルエンで洗浄し、トルエンーメタノール＝98:2の混合溶媒で溶出した。C成分を含む溶出液をあわせ、濃縮乾固した。

得られた残渣を少量のメタノールに溶解し、Sephadex LH-20（ファルマシア製）のカラム（内径20mm、長さ950mm）に付し、メタノールで溶出した。C成分を含む溶出液をあわせ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VDI207Cの純粋な白

色粉末256mgを得た。

VD1207C構造解析データ

1. 色及び性状：白色粉末

2. 分子式： $C_{25}H_{34}O_8$

3. マススペクトル (FAB-MS)： $m/z$  481 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

4. 比旋光度： $[\alpha]^{25}_D$  +50.2 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：253 (19500), 277 (16300), 341 (8700)

酸性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：253 (25400), 277 (18400), 352 (7600)

塩基性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：277 (17100), 334 (25200)

6. 赤外吸収スペクトル：

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、 $cm^{-1}$ )

2960, 1640, 1460, 1390, 1300, 1250, 1170, 1090, 1040, 930, 830,

750, 680, 590

7.  $^1H$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル $^1H$ -シフト (J値)

10.43 (1H, s), 8.05 (1H, s), 4.96 (1H, d, 2.5), 4.34 (1H, d, 6.5),

4.41 (1H, ddd, 11.5, 7.5, 1.5), 4.19 (1H, ddd, 11.5, 11.5, 5), 3.27 (1H, t, 6.5),

3.22 (3H, s), 3.68 (1H, ddd, 9.5, 7.5, 4.5), 2.03 (1H, ddd, 11.5, 1.5),

1.48 (1H, ddd, 11.5, 11.5, 11), 1.96 (1H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (2H, m),

1.24 (2H, m), 0.88 (3H, d, 6.5), 0.96 (3H, d, 6.5), 0.88 (3H, t, 7.5),

1.07 (3H, t, 7.5), 14.21 (1H, brs), 12.99 (1H, brs), 2.99 (1H, d, 2.5),

1.62 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}C$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル $^{13}C$ -シフト

207.3 (s), 194.4 (d), 167.9 (s), 167.4 (s), 137.5 (d), 120.3 (s), 113.2 (s),

109.1 (s), 94.5 (d), 80.5 (d), 69.8 (d), 62.6 (d), 61.8 (s), 59.7 (d), 57.2 (q),

49.3 (d), 36.9 (t), 33.7 (d), 32.1 (t), 20.7 (t), 20.6 (t), 18.7 (q), 17.9 (q).

14.2 (q), 10.5 (q)

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムジイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 6.0min.

実施例6 VD1207D精製及び構造解析

実施例1で得られたD成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC (カラム: J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムジイ社製、移動層: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4、流速: 12mL/min、検出: 254nmにおける紫外吸収、保持時間: 37.1分) に付した。この分取をくりかえし、D成分の単一ピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

得られた残渣を少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート (シリカゲル60 No. 13895メルク社製) で展開溶媒 (ヘキサン-アセトン=7:3) を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ (254nm) でD成分のスポットを確認し、D成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート (シリカゲル60 No. 5744メルク社製) で展開溶媒 (トルエン-メタノール=9:1) を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ (254nm) でD成分のスポットを確認し、D成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207Dの純粋な淡橙色粉末64mgを得た。

## VD1207D構造解析データ

1. 色及び性状： 淡橙色粉末

2. 分子式：  $C_{24}H_{34}O_8$

3. マススペクトル (FAB-MS) :  $m/z$  451 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

4. 比旋光度 :  $[\alpha]_D^{25}$  -13.0 (c 0.1,  $CHCl_3$ )

5. 紫外吸収スペクトル :

中性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 255 (23000), 276 (16300), 352 (7800)

酸性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 255 (27300), 276 (18000), 357 (7800)

塩基性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 279 (18000), 338 (26400)

6. 赤外吸収スペクトル :

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $cm^{-1}$ )

3440, 2960, 2870, 1630, 1460, 1390, 1300, 1270, 1190, 1090, 1040,

930, 830, 680, 620, 550

7.  $^1H$  NMRスペクトル :

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1H$ -シフト (J値)

10.41 (1H, s), 7.74 (1H, s), 4.99 (1H, d, 3), 4.38 (1H, ddd, 11.5, 9, 1.5),

4.20 (1H, ddd, 11.5, 11.5, 4.5), 3.29 (1H, dd, 7, 6), 3.56 (1H, ddd, 9, 9, 4),

2.47 (1H, dd, 13.5, 7), 2.42 (1H, dd, 13.5, 7), 2.02 (1H, ddd, 12, 4.5, 1.5),

1.42 (1H, ddd, 12, 11.5, 11.5), 1.83 (2H, m), 1.91 (1H, m), 0.92 (3H, d, 6.5),

0.92 (3H, d, 6.5), 1.61 (2H, m), 1.25 (2H, m), 0.88 (3H, t, 7.5), 1.08 (3H, t, 7.5),

14.15 (1H, brs), 12.98 (1H, brs), 2.74 (1H, d, 3), 1.55 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}C$  NMRスペクトル :

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}C$ -シフト

206.7 (s), 194.3 (d), 168.0 (s), 167.5 (s), 139.4 (d), 121.0 (s), 112.5 (s),

109.3 (s), 94.5 (d), 69.8 (d), 62.4 (d), 61.8 (s), 59.8 (d), 49.4 (d), 37.9 (t),

37.3 (t), 32.1 (t), 28.3 (d), 22.3 (q), 22.2 (q), 20.6 (t), 20.6 (t), 14.2 (q),

10.5 (q)

9. 溶解性 :

可溶：酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶：中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm（ワイエムシイ社製）

溶媒：アセトニトリルー10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）＝6:4

流速：1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：7.0min.

実施例7 VD1207E精製及び構造解析

実施例1で得られたE成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC（カラム：J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層：アセトニトリルー10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）＝6:4、流速：12mL/min、検出：254nmにおける紫外吸収、保持時間：37.8分）に付した。この分取をくりかえし、E成分の単一ピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート（シリカゲル60 No. 5744メルク社製）で展開溶媒（トルエンーメタノール＝9:1）を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ（254nm）でE成分のスポットを確認し、E成分を酢酸エチルーメタノール＝1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207Eの純粋な白色粉末16mgを得た。

VD1207E構造解析データ

1. 色及び性状：白色粉末
2. 分子式： $C_{26}H_{30}O_9$
3. マススペクトル（FAB-MS）： $m/z$  495（ $M+H$ ）<sup>+</sup>
4. 比旋光度： $[\alpha]^{25}_D$  -82.6（c 0.1,  $CHCl_3$ ）
5. 紫外吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm（ $\epsilon$ ）：254（22500）、276（17700）、341（9300）



酸性メタノール中： $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ )：253(29100)，276(20100)，352(8200)

塩基性メタノール中： $\lambda_{\max}$  nm( $\epsilon$ )：277(19400)，333(26200)

6. 赤外部吸収スペクトル：

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、 $\text{cm}^{-1}$ )

3440, 2960, 1640, 1460, 1390, 1300, 1260, 1180, 1090, 1020, 930,

830, 740, 680, 590, 570

7.  $^1\text{H}$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1\text{H}$ -シフト (J値)

10.42 (1H, s), 8.13 (1H, s), 4.95 (1H, d, 3), 4.35 (1H, d, 5.5), 4.33 (1H, ddd, 12.7, 1.5), 4.17 (1H, ddd, 11.5, 11.5, 4.5), 3.28 (1H, dd, 7.6), 3.23 (3H, s), 3.72 (1H, ddd, 10.7, 3.5), 1.89 (1H, ddd, 13.5, 10.4, 5), 1.58 (1H, m), 2.02 (1H, ddd, 12.4, 5, 1.5), 1.47 (1H, ddd, 12, 12, 11.5), 1.92 (1H, sept, d, 7.5, 5), 1.46 (1H, m), 0.88 (3H, d, 6.5), 0.87 (3H, d, 6.5), 1.61 (2H, m), 0.91 (3H, d, 7), 0.92 (3H, d, 7), 1.08 (3H, t, 7.5), 14.21 (1H, s), 12.98 (1H, s), 2.69 (1H, brs), 1.53 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

207.2 (s), 194.4 (d), 167.9 (s), 167.3 (s), 137.6 (d), 120.3 (s), 113.1 (s), 109.2 (s), 94.5 (d), 80.6 (d), 70.3 (d), 62.6 (d), 61.7 (s), 59.7 (d), 57.2 (q), 47.6 (d), 38.7 (t), 36.9 (t), 33.8 (d), 26.1 (d), 23.6 (q), 21.8 (q), 20.6 (t), 18.7 (q), 17.5 (q), 10.5 (q)

9. 溶解性：

可溶：酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶：中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒：アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速：1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：7.4min.

#### 実施例 8 VD1207F精製及び構造解析

実施例1で得られたF成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) =45:55の混合溶液で予め平衡化しておいたYMC-GEL ODS-AM 120-S50 (ワイエムシィ社製)のカラム (内径30mm、長さ450mm) に付した。同じ組成の混合溶媒、1:1の組成の混合溶媒で洗浄した後、55:45の組成の混合溶媒、60:40の組成の混合溶媒で順次極性を下げて溶出した。F成分を含む溶出液を集め、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル (Silica Gel FL100D、富士シリシア化学社製) を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム (内径20mm、長さ500mm) に付した。ヘキサン、ヘキサン-アセトン=95:5の混合溶媒で洗浄し、9:1の混合溶媒、85:15の混合溶媒で溶出した。F成分を含む溶出液をあわせ、濃縮乾固した。

得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル (Silica Gel FL100D、富士シリシア化学社製) を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム (内径20mm、長さ500mm) に付した。トルエンで洗浄し、トルエン-メタノール=99:1の混合溶媒、98:2の混合溶媒で溶出した。F成分を含む溶出液をあわせ、濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート (シリカゲル60 No. 5744メルク社製) で展開溶媒 (トルエン-メタノール=9:1) を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ (254nm) でF成分のスポットを確認し、F成分を酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207Fの純粋な淡橙色粉末125mgを得た。

#### VD1207F構造解析データ

1. 色及び性状：淡橙色粉末
2. 分子式：C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>

3. マススペクトル (FAB-MS) :  $m/z$  495 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

4. 比旋光度 :  $[\alpha]_D^{25}$  +54.1 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外吸収スペクトル :

中性メタノール中 :  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 254 (14900), 278 (12100), 348 (5700)

酸性メタノール中 :  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 254 (17400), 278 (13300), 351 (5600)

塩基性メタノール中 :  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 277 (12400), 338 (20000)

6. 赤外吸収スペクトル :

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $\text{cm}^{-1}$ )

3420, 2960, 1630, 1460, 1380, 1300, 1260, 1180, 1090, 1040, 930,  
830, 740, 680, 590, 570

7. <sup>1</sup>H NMRスペクトル :

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル <sup>1</sup>H-シフト (J値)

10.42 (1H, s), 8.08 (1H, s), 4.94 (1H, d, 2.5), 4.34 (1H, d, 6), 4.30 (1H, m),  
4.17 (1H, ddd, 12, 12, 4.5), 3.27 (1H, dd, 7.6), 3.22 (3H, s), 3.75 (1H, ddd, 10.5, 7,  
3.5), 1.90 (1H, ddd, 13, 10.5, 4.5), 1.59 (1H, m), 2.02 (1H, ddd, 12.5, 5.2),  
1.46 (1H, ddd, 12, 12, 12), 1.90 (1H, sept, d, 7.7), 1.46 (2H, m), 0.88 (3H, d, 6.5),  
0.86 (3H, d, 6.5), 1.59 (2H, m), 0.90 (3H, d, 7), 0.94 (3H, d, 7), 1.07 (3H, t, 7.5),  
14.21 (1H, brs), 12.98 (1H, brs), 2.95 (1H, d, 3), 1.59 (1H, d, 12)

8. <sup>13</sup>C NMRスペクトル :

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル <sup>13</sup>C-シフト

207.2 (s), 194.4 (d), 167.9 (s), 167.3 (s), 137.6 (d), 120.2 (s), 113.3 (s),  
109.2 (s), 94.5 (d), 80.7 (d), 70.5 (d), 62.7 (d), 61.7 (s), 59.7 (d), 57.2 (q),  
47.2 (d), 38.7 (t), 36.6 (t), 33.9 (d), 26.2 (t), 23.6 (q), 21.9 (q), 20.6 (t),  
18.7 (q), 17.7 (q), 10.5 (q).

9. 溶解性 :

可溶 : 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶 : 中性の水

## 10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min.

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 8.0min.

## 実施例9 VD1207F' 精製及び構造解析

実施例1で得られたF'成分を含むフラクションに溶解し、分取HPLC (カラム: J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 60:40、流速: 12mL/min、検出: 254nmにおける紫外吸収、保持時間: F': 48.3分) に付した。この分取をくりかえし、F'成分のピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207 F'の純粋な淡黄色粉末をそれぞれ2.8mg得た。

## VD1207F' 構造解析データ

1. 色及び性状: 淡黄色粉末

2. 分子式:  $C_{26}H_{29}O_9$

3. マススペクトル (FAB-MS):  $m/z$  495 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

4. 比旋光度:  $[\alpha]^{25}_D +4.4$  (c 0.04,  $CHCl_3$ )

5. 紫外吸収スペクトル:

中性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 253 (21200), 286 (24500), 340 (11600)

酸性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 253 (24100), 285 (25100), 346 (10000)

塩基性メタノール中:  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ): 276 (16500), 346 (40300)

6. 赤外部吸収スペクトル:

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $cm^{-1}$ )

3330, 2960, 2870, 1720, 1620, 1460, 1380, 1300, 1170, 1090, 930, 830,

680, 590

7.  $^1\text{H}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1\text{H}$ -シフト (J値)

10.43 (1H, s), 8.03 (1H, s), 4.98 (1H, d, 2.5), 4.34 (1H, d, 6), 4.40 (1H, ddd, 11.5, 8.1.5), 4.19 (1H, ddd, 11.5, 11.5.5), 3.28 (1H, dd, 7.6), 3.23 (3H, s), 3.61 (1H, td, 8.5.5), 2.04 (1H, m), 1.43 (1H, ddd, 11.5, 11.5.11.5), 1.92 (1H, m), 1.84 (2H, m) or 1.19 (2H, m), 1.84 (2H, m) or 1.19 (2H, m), 1.28 (2H, m), 1.60 (2H, m), 0.90 (3H, d, 7), 0.94 (3H, d, 7), 0.84 (3H, t, 7), 1.08 (3H, t, 7.5), 14.20 (1H, brs), 12.99 (1H, brs), 2.66 (1H, d, 3.5), 1.53 (1H, s)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

207.2 (s), 194.3 (d), 167.8 (s), 167.3 (s), 137.4 (d), 120.3 (s), 113.1 (s), 109.1 (s), 94.5 (d), 80.5 (d), 69.7 (d), 62.5 (d), 61.7 (s), 59.7 (d), 57.2 (d), 49.5 (d), 36.9 (t), 33.8 (t), 29.6 (t), 29.5 (t), 22.8 (t), 20.6 (t), 18.6 (q), 17.6 (q), 13.8 (q), 10.5 (q)

## 9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

## 10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 8.2min.

## 実施例10 VD1207G, G1, G2精製及び構造解析

実施例1で得られたG1, G2成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC (カラム: J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 3.5) = 65:35、流速: 12mL/min、検出: 254nmにおける紫外吸収、保持時間: G1,

G2 : 33.8分、 G' : 35.5分) に付した。この分取をくりかえし、G1, G2成分のピークを示す溶出液、 G'成分のピークを示す溶出液をそれぞれ併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固し、G1, G2成分を含むフラクションとVD1207 G'の純粋な淡黄色粉末を4mgを得た。

G1, G2成分を含むフラクションは少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート(シリカゲル60 No. 5744メルク社製)で展開溶媒(ヘキサン-アセトン=7:3)を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ(254nm)でG1, G2成分のスポットを確認し、併せて酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。

このものを少量の酢酸エチルに溶解し、薄層クロマトグラフプレート(シリカゲル60 No. 5744、メルク社製)で展開溶媒(トルエン-メタノール=17:3)を用いて分取薄層クロマトグラフを行った。展開後UVランプ(254nm)でG1, G2成分それぞれのスポットを確認し(Rf値; G1 : 0.30、G2 : 0.24)、G1, G2成分それぞれを酢酸エチル-メタノール=1:1の溶媒で溶出させ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207 G1, G2の純粋な白色粉末をそれぞれ7mg、8mg得た。

#### VD1207G' 構造解析データ

1. 色及び性状 : 淡黄色粉末

2. 分子式 :  $C_{26}H_{37}O_8$

3. マススペクトル (FAB-MS) :  $m/z$  465 (M+H)<sup>+</sup>

4. 比旋光度 :  $[\alpha]^{25}_D +2.3$  (c 0.04, CHCl<sub>3</sub>)

5. 紫外吸収スペクトル :

中性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 254 (86600), 277 (59500), 355 (26800)

酸性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 255 (91500), 277 (61500), 356 (26100)

塩基性メタノール中 :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 279 (62800), 337 (84800)

6. 赤外吸収スペクトル :

KBr 粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、 $cm^{-1}$ )

3390, 2960, 2870, 1630, 1460, 1390, 1300, 1180, 1090, 1040, 930, 830,

680, 620, 550

7.  $^1\text{H}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1\text{H}$ -シフト (J値)

10.42 (1H, s), 7.73 (1H, s), 5.00 (1H, d, 2.5), 4.38 (1H, ddd, 11.5, 8.1, 5.5),  
4.20 (1H, ddd, 11.5, 11.5, 5.5), 3.30 (1H, dd, 7.6), 3.54 (1H, td, 8.5, 5.5),  
2.48 (1H, dd, 13.5, 7), 2.42 (1H, dd, 13.5, 7), 2.03 (1H, ddd, 12.5, 5.5, 1.5),  
1.42 (1H, ddd, 12, 12, 12), 1.84 (2H, m), 1.20 (2H, m), 1.91 (1H, m), 1.28 (2H, m),  
0.93 (3H, d, 6.5), 0.92 (3H, d, 6.5), 1.63 (2H, m), 0.85 (3H, t, 7),  
1.09 (3H, t, 7.5), 14.16 (1H, s), 12.99 (1H, s), 2.69 (1H, d, 3), 1.50 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

206.7 (s), 194.3 (d), 168.0 (s), 167.5 (s), 139.5 (d), 121.0 (s), 112.6 (s),  
109.4 (s), 94.5 (d), 69.8 (d), 62.4 (d), 61.8 (s), 59.8 (d), 49.6 (d), 37.9 (t),  
37.3 (t), 29.7 (t), 29.5 (t), 28.3 (d), 22.8 (t), 22.4 (q), 22.2 (q), 20.6 (t),  
13.8 (q), 10.5 (q)

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 9.8min.

VD1207G1構造解析データ

1. 色及び性状: 白色粉末

2. 分子式:  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8$

3. マススペクトル (FAB-MS):  $m/z$  465 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

4. 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25}$ , -11.5 (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )

5. 紫外部吸収スペクトル:

中性メタノール中:  $\lambda_{\text{max}}$  nm( $\epsilon$ ): 254(25600), 276(17200), 355(7800)

酸性メタノール中:  $\lambda_{\text{max}}$  nm( $\epsilon$ ): 255(29800), 276(19500), 356(8400)

塩基性メタノール中:  $\lambda_{\text{max}}$  nm( $\epsilon$ ): 279(20000), 337(27200)

6. 赤外部吸収スペクトル:

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数,  $\text{cm}^{-1}$ )

3440, 2960, 2870, 1630, 1460, 1390, 1300, 1190, 1100, 1030, 930, 910,  
820, 680, 620, 550

7.  $^1\text{H}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1\text{H}$ -シフト (J値)

10.42 (1H, s), 7.74 (1H, s), 5.01 (1H, d, 3.5), 4.38 (1H, ddd, 12.8, 5.2),  
4.20 (1H, ddd, 12.11, 5.4, 5), 3.34 (1H, dd, 7.6), 3.56 (1H, ddd, 9.8, 5.4, 5),  
2.03 (1H, ddd, 12.4, 5.2), 1.42 (1H, ddd, 12.12, 12), 2.47 (1H, dd, 13.5, 7),  
2.42 (1H, dd, 13.5, 7), 1.83 (2H, m), 1.66 (1H, m), 1.55 (1H, m), 1.91 (1H, m),  
1.55 (2H, m), 1.24 (2H, m), 0.93 (3H, d, 6.5), 0.92 (3H, d, 6.5), 0.99 (3H, d, 7.5),  
0.89 (3H, t, 7.5), 14.15 (1H, s), 12.99 (1H, s), 2.52 (1H, d, 3.5), 1.50 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

206.7 (s), 194.3 (d), 168.0 (s), 167.5 (s), 139.4 (d), 121.0 (s), 112.5 (s),  
109.4 (s), 94.5 (d), 69.8 (d), 62.4 (d), 61.5 (s), 58.6 (d), 49.4 (d), 37.9 (t),  
37.3 (t), 32.1 (t), 31.2 (t), 29.3 (d), 28.3 (t), 22.3 (t), 20.6 (q), 19.9 (q),  
14.2 (q), 13.9 (q).

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80, 内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)



溶媒：アセトニトリル－10mMリン酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）＝6:4

流速：1mL/min

検出波長：254nmにおける紫外吸収

保持時間：9.4min

1 1. 薄層クロマトグラフィー：

担体：シリカゲル60 F254（メルク社製、ドイツ）

展開溶媒：トルエン/メタノール（17:3）

Rf値：0.30.

VD1207G2構造解析データ

1. 色及び性状：白色粉末

2. 分子式： $C_{28}H_{36}O_8$

3. マススペクトル（FAB-MS）： $m/z$ 465（M+H）<sup>+</sup>

4. 比旋光度： $[\alpha]_D^{25}$  -11.2（c 0.1, CHCl<sub>3</sub>）

5. 紫外吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：255(28000), 277(19200), 356(8800)

酸性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：255(30900), 277(20400), 356(8700)

塩基性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ )：278(21100), 337(28100)

6. 赤外吸収スペクトル：

KBr粉末中で測定した。主な吸収を示す。（波数、cm<sup>-1</sup>）

3440, 2960, 1640, 1460, 1390, 1340, 1300, 1270, 1190, 1090, 1040,

910, 880, 830, 730, 680, 620, 550

7. <sup>1</sup>H NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル <sup>1</sup>H-シフト（J値）

10.42(1H, s), 7.78(1H, s), 4.99(1H, d, 3), 4.30(1H, ddd, 11, 7.5, 1.5),

4.18(1H, ddd, 12, 12, 4.5), 3.29(1H, dd, 7, 6), 3.65(1H, ddd, 10, 5, 7, 3, 5),

1.90(1H, ddd, 13, 5, 10, 5, 4, 5), 1.63(1H, m), 2.50(1H, dd, 14, 7),

2.41(1H, dd, 14, 7), 1.99(1H, ddd, 12, 5, 5, 2), 1.45(1H, ddd, 12, 5, 12, 11),

1.92(1H, sept, d, 7, 7), 1.45(1H, m), 0.88(3H, d, 6, 5), 0.93(3H, d, 6, 5),

0.92 (3H, d, 6.5), 0.87 (3H, d, 6.5), 1.60 (3H, qd, 7.7), 1.09 (3H, d, 7.5),  
14.20 (1H, s), 13.00 (1H, s), 2.50 (1H, d, 3.5), 1.50 (1H, d, 12)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

206.7 (s), 194.3 (d), 168.0 (s), 167.5 (s), 139.4 (d), 121.0 (s), 112.7 (s),  
109.4 (s), 94.5 (d), 70.6 (d), 62.5 (d), 61.8 (s), 59.8 (d), 47.4 (d), 39.0 (t),  
38.0 (t), 37.1 (t), 28.2 (d), 26.2 (d), 23.7 (q), 22.4 (q), 22.2 (q), 22.0 (q),  
20.6 (t), 10.5 (q)

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

保持時間: 9.4min

11. 薄層クロマトグラフィー:

担体: シリカゲル60 F254 (メルク社製、ドイツ)

展開溶媒: トルエン/メタノール (17:3)

Rf値: 0.24。

実施例 11 VD1207H 精製及び構造解析実施例

実施例1で得られたH成分を含むフラクションを少量のジメチルスルホキシドに溶解し、分取HPLC (カラム: J'sphere ODS-H80、内径20mm、長さ250mm、ワイエムシイ社製、移動層: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 65:35、流速: 12mL/min、検出: 254nmにおける紫外吸収、保持時間: 36.6分) に付した。この分取をくりかえし、H成分の単一ピークを示す溶出液を併せ、アセトニトリルを減圧下留去した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を脱イオ

ン水で洗浄後、減圧下濃縮乾固した。

得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、少量のシリカゲル (Silica Gel FL100D、富士シリシア化学社製) を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルのカラム (内径20mm、長さ380mm) に付した。ヘキサンで洗浄し、ヘキサン-アセトン=95:5の混合溶媒、90:10の混合溶媒で溶出した。H成分を含む画分をあわせ、濃縮乾固した。

得られた残渣を少量のメタノールに溶解し、Sephadex LH-20 (ファルマシア製) のカラム (内径20mm、長さ950mm) に付し、メタノールで溶出した。H成分を含む溶出液をあわせ、減圧下濃縮乾固した。残渣を凍結乾燥して、VD1207Hの純粋な白色粉末75mgを得た。

#### VD1207H構造解析データ

1. 色及び性状：淡黄色粉末

2. 分子式： $C_{25}H_{36}O_8$

3. マススペクトル (FAB-MS) :  $m/z$  465 (M+H)<sup>+</sup>

4. 比旋光度： $[\alpha]_D^{25}$  -1.6 (c 0.1,  $CHCl_3$ )

5. 紫外外部吸収スペクトル：

中性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 255 (28000), 277 (19200), 356 (8800)

酸性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 255 (30900), 277 (20400), 356 (8700)

塩基性メタノール中： $\lambda_{max}$  nm( $\epsilon$ ) : 278 (21100), 337 (28100)

6. 赤外部吸収スペクトル：

KBr 粉末中で測定した。主な吸収を示す。(波数、 $cm^{-1}$ )

3420, 2960, 2870, 2670, 1620, 1400, 1300, 1150, 1090, 1040, 910, 830,

760, 690, 620, 560

7.  $^1H$  NMRスペクトル：

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^1H$ -シフト (J値)

7.71 (1H, s), 5.01 (1H, d, 2.5), 4.38 (1H, ddd, 12.8, 1.5), 4.20 (1H, ddd, 12.11.5,

4.5), 3.30 (1H, dd, 7.6), 3.58 (1H, ddd, 8.5.8.4.5), 2.47 (1H, dd, 13.5.7),

2.41 (1H, dd, 13.5.7), 2.02 (1H, ddd, 12.4.5.1.5), 1.42 (1H, ddd, 12.12.12),

2.79 (3H, s), 1.83 (2H, m), 1.92 (1H, m), 0.91 (3H, d, 6.5), 0.92 (3H, d, 6.5),  
1.64 (2H, m), 1.25 (2H, m), 0.88 (3H, t, 7.5), 1.09 (3H, t, 8), 15.11 (1H, s),  
14.73 (1H, s), 2.73 (1H, d, 2.5), 1.54 (1H, d, 11.5)

8.  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル:

重クロロホルム溶液中で測定したスペクトル  $^{13}\text{C}$ -シフト

206.6 (s), 205.9 (s), 170.0 (s), 167.7 (s), 137.8 (d), 121.5 (s), 112.1 (s),  
109.5 (s), 94.5 (d), 69.9 (d), 62.5 (d), 61.8 (s), 59.8 (d), 49.3 (d), 38.6 (t),  
37.4 (t), 33.6 (q), 32.2 (t), 28.1 (d), 22.4 (q), 22.3 (q), 20.6 (t), 20.5 (t),  
14.2 (q), 10.5 (q)

9. 溶解性:

可溶: 酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 中性の水

10. 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: J'sphere ODS-H80、内径4.6mm、長さ75mm (ワイエムシイ社製)

溶媒: アセトニトリル-10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 (pH3.5) = 6:4

流速: 1mL/min

検出波長: 254nmにおける紫外吸収

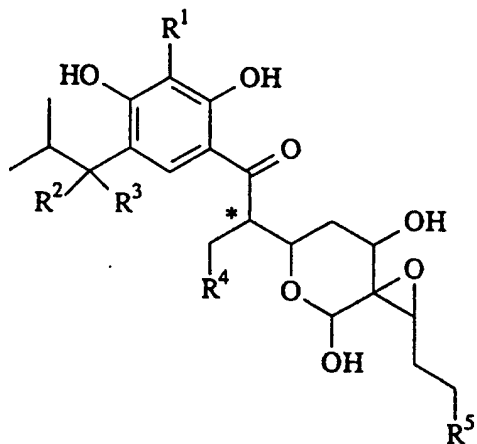
保持時間: 10.3min

以上の解析データから各化合物の構造は表1に記載した。

表 1

化合物	MW	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
A1	450	H	=O	i-Pr	H
A2	450	H	=O	i-Pr	H
B	480	CHO	OCH <sub>3</sub> , H	Et	H
C	480	CHO	OCH <sub>3</sub> , H	Et	H
D	450	CHO	H, H	Et	H
E	494	CHO	OCH <sub>3</sub> , H	i-Pr	H
F	494	CHO	OCH <sub>3</sub> , H	i-Pr	H
F'	480	CHO	OCH <sub>3</sub> , H	n-Pr	H
G1	464	CHO	H, H	Et	CH <sub>3</sub>
G2	464	CHO	H, H	i-Pr	H
G'	480	CHO	H, H	n-Pr	H
H	464	COCH <sub>3</sub>	H, H	Et	H
U1	480	H	=O	Et	H
U2	480	H	=O	Et	H

なお、BとC、EとF、A1とA2、U1とU2はそれぞれ \*位の立体の異なるエピマーである。



#### 実施例 1 2 血管新生阻害活性

ラット大動脈片をコラーゲン内にて培養して観察される管腔形成の阻害度を血管新生阻害活性とした。すなわち、Sprague-Dawley系雌ラット（8-12週齢）より摘出した大動脈をハンクス液で洗浄しながら周辺の脂肪組織を丁寧に除去した。

大動脈を切開し 2 mm 角の切片を作成した後、24 ウェルプレート内へ内皮細胞面を上にして静置する。次に、500  $\mu$ l の中性化したタイプ I コラーゲンゲル (Cell Matrix Type I-A: 新田ゼラチン) を各ウェルへ注ぎ、クリーンベンチ内で室温下約 20 分間放置してゲルを固まらせた。ゲルが固まったことを確認した後に 500  $\mu$ l の MCDB131 (クロレラ工業) 培地を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5 % CO<sub>2</sub>) で 37℃ 下培養した。翌日試料を含む MCDB131 培地と培養液を交換し、更に培養 4 日目に再度試料を含む MCDB131 培地と交換して培養を続けた。そして、試料添加後 7 日目の時点に大動脈周囲に形成された毛細血管数を計測した。その結果を試料無添加時に形成された毛細血管数を 100 % とした時の各試料の IC<sub>50</sub> 値を表 2 に示す。

表 2

VD1207	IC <sub>50</sub> 値 ( $\mu$ g/ml)
A2	1
B	0.053
C	0.050
D	0.019
E	0.047
F	0.067
F'	0.10
G1	0.070
G2	0.034
G'	0.11
H	0.38

### 実施例 13 内皮細胞増殖抑制作用

ECM 培地 (三光純薬) で培養したヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC; 三光純薬) を  $1 \times 10^4$  cell/ml に調整し、96 ウェルプレートに各 100  $\mu$ l づつ分注した。そして、一晚培養した後に試料を含む 100  $\mu$ l の培養液を加えて 3 日間培養し、その時の細胞数を MTT 法にて測定した。すなわち、0.33 % 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を含む PBS 溶液を 50  $\mu$ l 添加

して更に3-4時間培養を続けた。培養上清を除去した後に100  $\mu$  lのDMSO溶液を加えて細胞内に生成したホルマザンを溶解し、460 nmの波長での吸光度をプレートリーダーによって測定した。その結果を試料無添加時の吸光度を100%としてIC<sub>50</sub>値を算出し、表3に示した。

表 3

VD1207	IC <sub>50</sub> 値 ( $\mu$ g/ml)
A1	17.6
A2	18.7
B	0.24
C	0.08
D	0.18
E	0.21
F	0.06
G1	0.11
G2	0.07
H	0.52
U1	6.5
U2	7.1

#### 実施例 14 内皮細胞に対する接着分子発現抑制作用

ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を96穴プレートでconfluentの状態にまで培養した。培養液を除去し、各ウェルに150  $\mu$  lの新しい培養液を加えた後に20  $\mu$  lの試料溶液を加えた。15分後に最終濃度が1 ng/mlとなるように30  $\mu$  lのTNF $\alpha$ を加え、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃下4時間培養した。次に、培養液を除去してリン酸バッファー (PBS) で2回細胞を洗浄、さらに0.025% glutaraldehydeを含むPBS溶液を加えて室温で6分間放置して細胞を固定した。細胞を固定後200  $\mu$  lの0.25% BSAを含むリン酸バッファー (PBSA) で2回細胞を洗浄した後に1  $\mu$  g/mlのマウス抗ヒトVCAM-1 (R & D systems)あるいはマウス抗ヒトE-selectin抗体 (R & D systems)を含むPBSA液を各ウェルに100  $\mu$  lづつ加えた。室温下30分

間放置した後に再び細胞を洗浄し、100  $\mu$ lのperoxidase-conjugatedヒツジ抗マウス抗体 (Cosmo Bio Co., Ltd.) を含むPBSA液を加えた。そして、室温で30分間放置した後に細胞を洗浄し100  $\mu$ lの3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) 基質液を加えて発色させた。次に、100  $\mu$ lの1Mリン酸で発色を止め450 nmでの吸光度を測定した。TNF $\alpha$ 刺激によって発色した吸光度を100%としたときの各試料のIC<sub>50</sub>値を表4に示す。

表 4

化合物	VCAM-1 ( $\mu$ g/ml)	E-select ( $\mu$ g/ml)
VD1207 B	2.48	4.0
C	0.85	1.23
D	1.11	1.40
E	2.59	4.44
F	< 0.63	0.84
H	1.06	2.48

#### 実施例 1 5 VD1207Cのin vivo血管新生抑制作用

VD1207Cのin vivoでの血管新生抑制作用を調べるために、ヒト大腸癌WiDr細胞により誘導される血管新生が、VD1207C投与により抑制されるかどうかを検討した。

マウスに、WiDr細胞を封入したチャンバーを移植した後、0.5, 1.0, 2.0 mg/kgのVD1207Cを4日間にわたり一日一回腹腔内投与した。腫瘍により誘導される血管新生量は、<sup>51</sup>Crラベルした赤血球を静注しチャンバー近傍皮内の放射活性を測定することにより、血液量として定量した。図1にはVD1207Cの各投与量において新生された血管の量を示したが、1 mg/kgのVD1207C投与によりWiDr細胞により誘導される血管新生が有意差をもって抑制された。この結果より、VD1207Cがin vivoにおいても血管新生抑制活性を持つことが明らかとなった。

#### 実施例 1 6 VD1207Cの癌転移抑制作用

VD1207Cがin vivoでも血管新生抑制作用を有することから、マウス結腸癌Colon38-OT-7の肝臓への転移が、VD1207C投与により抑制されるかどうかを検討し



た。

肝高転移マウス結腸癌Colon38-OT-7をマウス盲腸に移植し、12日後より0.5, 1.0, 2.0 mg/kgのVD1207Cを一日一回腹腔内投与して、肝臓への転移巣の数を調べた。表5にはVD1207Cの各投与量における肝転移巣の数を示したが、VD1207Cは0.5 mg/kgの投与から転移巣の数を減少させ、2.0 mg/kgでは転移巣は全く観察されなかった。これらの結果より、VD1207Cは癌の転移を抑制する活性を有することが明らかとなった。

表 5

薬剤	用量 (mg/kg)	n	毒性による 死亡数	肝転移		肝転移の頻度
				肝転移巣の数 (平均値±STD)	中央値	
薬剤なし	-	8	-	2,6,10,17,21,29,41,63 (23.6±20.3)	19.0	8/8
VD1207C	0.5	8	1	0,0,0,1,16,25,26 (9.7±12.2)	1.0	5/7
	1.0	8	2	0,0,0,1,2,4 (1.2±1.6)	0.5	3/6
	2.0	8	3	0,0,0,0,0	0	0/5

#### 実施例 17 VD1207類縁体の安全性

VD1207B, C, D, E, F, G2の1 mg/kg, 2 mg/kgを4日間にわたり腹腔内へ連投し、VD1207類縁体の安全性を調べた。

その結果、図2に示すようにVD1207Cでは1 mg/kgで体重増加の抑制、2 mg/kgで体重減少が見られたが、その他の類縁体では体重減少は観察されなかった。また表6の剖検所見に示すように、VD1207C及びFに肝臓・腎臓・肺重量の増加が見られたが、他の類縁体では毒性が弱かった。

表 6

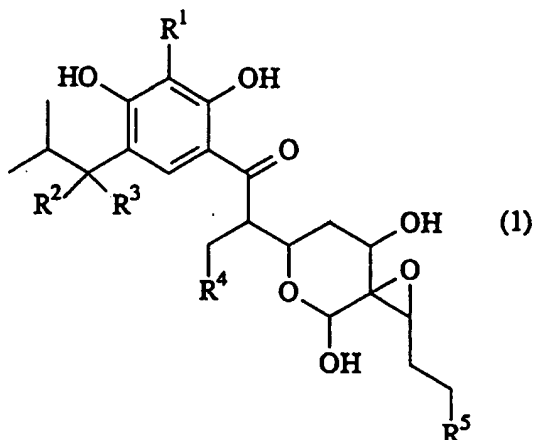
## 剖検所見

検査項目	B		C		D		E		F		G2	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
体重	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
摂水量	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
血液 (RBC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(WBC)	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	↓
(PLAT)	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
生化学 (UN)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(GPT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
臓器重さ (肝)	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
(腎)	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↑	↑	-	-
(肺)	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	↑	-	-
(脾)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

表中、NTは未測定を、-は異常なしを、↑及び↓は増加及び減少をそれぞれ示す。

## 請求の範囲

1. 一般式(1)で表わされる化合物、その塩又はその水和物。



(式中、R<sup>1</sup>は水素原子、アルデヒド基又は低級アシル基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は同一又は相異なり水素原子もしくは低級アルコキシ基、又は一緒になって酸素原子を意味し、R<sup>4</sup>は低級アルキル基、R<sup>5</sup>は水素原子又は低級アルキル基を意味する。但し、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が相異なり水素原子又はメトキシ基、R<sup>4</sup>がエチル基で、かつR<sup>5</sup>が水素原子である化合物は除く。)

2. 一般式(1)において、R<sup>1</sup>が水素原子、アルデヒド基又はアセチル基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一又は相異なり水素原子もしくはメトキシ基、又は一緒になって酸素原子、R<sup>4</sup>がエチル基、ノルマルプロピル基又はイソプロピル基、R<sup>5</sup>が水素原子又はメチル基である、請求項1記載の化合物(但し、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が相異なり水素原子又はメトキシ基、R<sup>4</sup>がエチル基で、かつR<sup>5</sup>が水素原子である化合物は除く)、その塩又はその水和物。

3. 一般式(1)において、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一で水素原子、R<sup>4</sup>がエチル基、R<sup>5</sup>が水素原子又はメチル基である、請求項1記載の化合物、その塩又はその水和物。

4. 一般式(1)において、R<sup>1</sup>がアルデヒド基、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が同一で水素原子、R<sup>4</sup>がノルマルプロピル基又はイソプロピル基、R<sup>5</sup>が水素原子である、請求項1記載

の化合物、その塩又はその水和物。

5. 一般式(1)において、 $R^1$ がアルデヒド基、 $R^2$ 及び $R^3$ が相異なり水素原子又はメトキシ基、 $R^4$ がノルマルプロピル基又はイソプロピル基、 $R^5$ が水素原子である、請求項1記載の化合物、その塩又はその水和物。

6. 一般式(1)において、 $R^1$ が水素原子、 $R^2$ 及び $R^3$ が一緒になって酸素原子、 $R^4$ がエチル基又はイソプロピル基、 $R^5$ が水素原子である、請求項1記載の化合物、その塩又はその水和物。

7. 一般式(1)において、 $R^1$ がアセチル基、 $R^2$ 及び $R^3$ が同一で水素原子、 $R^4$ がエチル基、 $R^5$ が水素原子である、請求項1記載の化合物、その塩又はその水和物。

8. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする医薬。

9. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする、血管新生阻害活性に基づく医薬。

10. 一般式(1)において、 $R^1$ がアルデヒド基、 $R^2$ 及び $R^3$ が相異なり水素原子又はメトキシ基、 $R^4$ がエチル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする、血管新生阻害活性に基づく医薬。

11. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする、接着分子VCAM-1又は/及びE-selectin発現抑制活性に基づく医薬。

12. 一般式(1)において、 $R^1$ がアルデヒド基、 $R^2$ 及び $R^3$ が相異なり水素原子又はメトキシ基、 $R^4$ がエチル基、 $R^5$ が水素原子である化合物、その塩又はその水和物を有効成分とする、接着分子VCAM-1又は/及びE-selectin発現抑制活性に基づく医薬。

13. ストレプトミセス・エスピー・エムイーアール・ヴィディ1207

(*Streptomyces* sp. Mer-VD1207, FERM P-15889) を栄養培地中で培養し、その培養液から請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物又はその塩を採取する事の特徴とする、請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物又はその塩の製造方法。

14. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物を薬理上有効量及び薬理上許容できる担体を含む医薬組成物。

15. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物の薬理上有効量を患者に投与し、血管新生阻害活性または接着分子VCAM-1又は／及びE-selectin発現抑制活性が有効な疾患を治療する方法。

16. 請求項1ないし7のいずれか一項に記載の化合物、その塩又はその水和物の、血管新生阻害活性または接着分子VCAM-1又は／及びE-selectin発現抑制活性が有効な疾患の治療剤を製造する用途。

図 1

VD1207C の各投与量において新生された血管の量

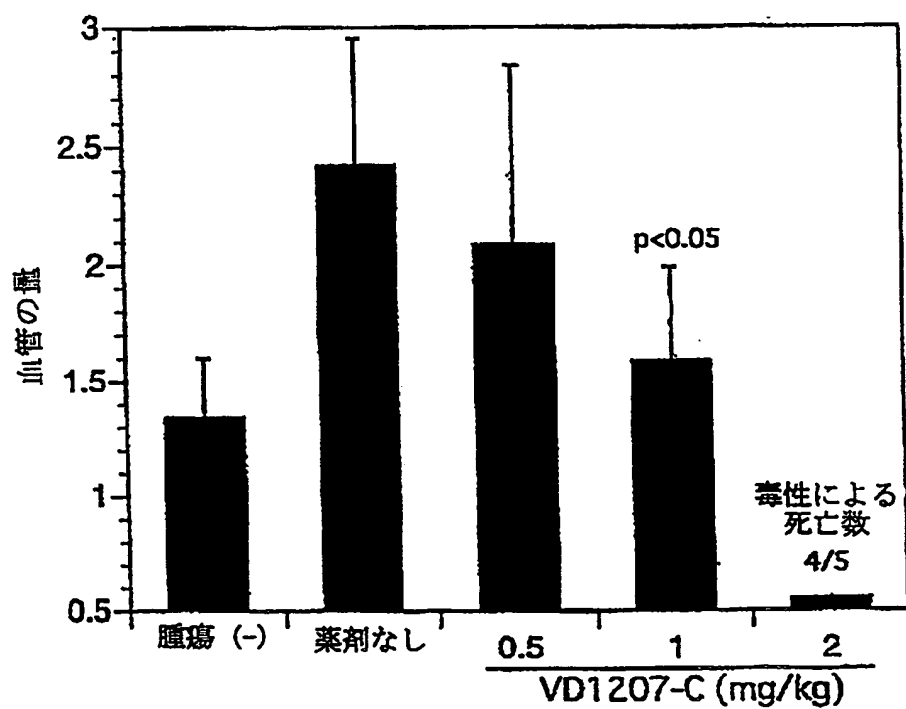
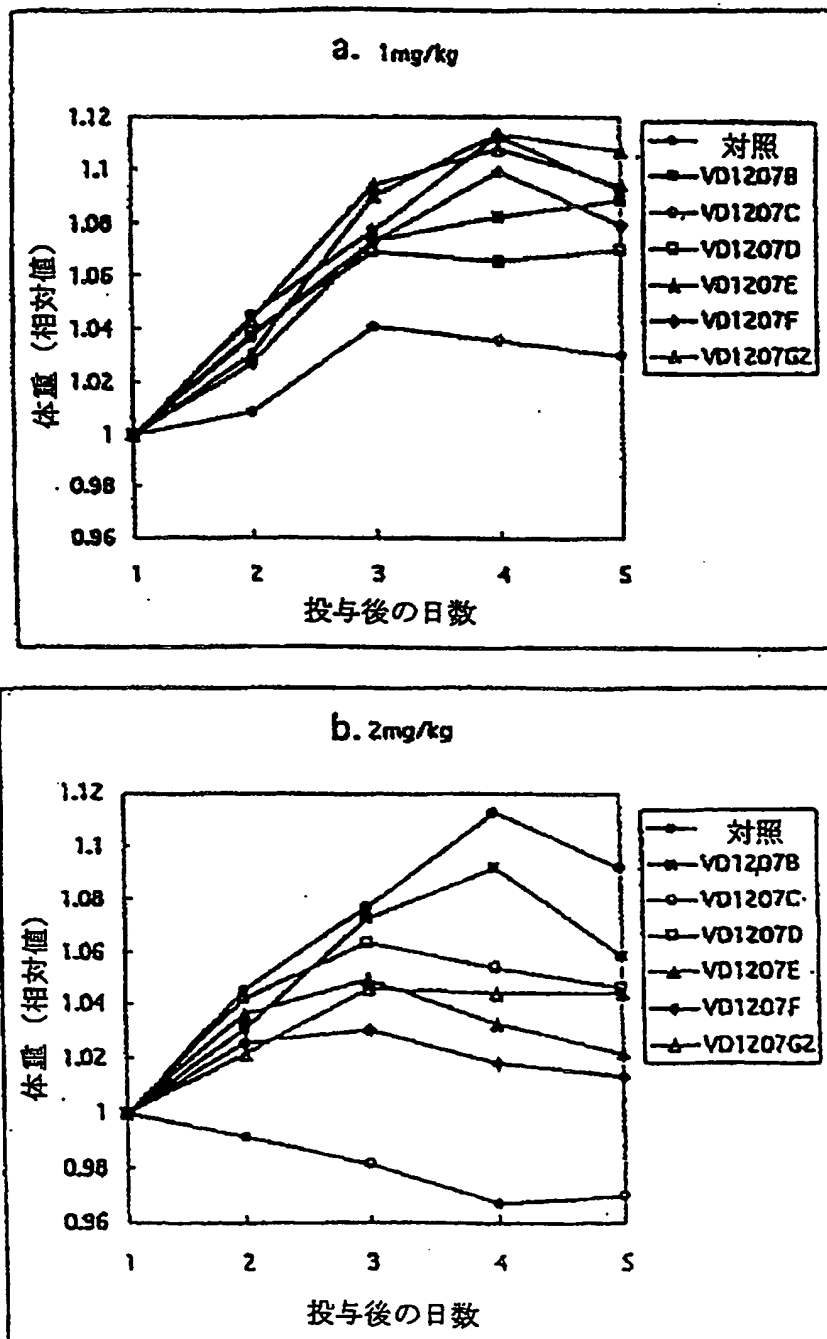


図 2

## VD1207 類縁体投与による体重変化



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02288

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07D493/10, A61K31/35, C12P17/18 // (C12P17/18, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07D493/10, A61K31/35, C12P17/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP, 62-294619, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 22 December, 1987 (22. 12. 87) (Family: none)	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 63-22583, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 30 January, 1988 (30. 01. 88) (Family: none)	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 63-48213, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 29 February, 1988 (29. 02. 88) (Family: none)	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 6-228144, A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 August, 1994 (16. 08. 94) (Family: none)	1-2, 13-14 /3-12, 16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 July, 1999 (27. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
10 August, 1999 (10. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02288

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02288

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>8</sup> C07D 493/10, A61K 31/35, C12P 17/18 // (C12P 17/18, C12R 1:465)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>8</sup> C07D 493/10, A61K 31/35, C12P 17/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP, 62-294619, A (出光興産株式会社) 22. 12月. 1987 (22. 12. 87) パテントファミリーなし	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 63-22583, A (出光興産株式会社) 30. 1月. 1988 (30. 01. 88) パテントファミリーなし	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 63-48213, A (出光興産株式会社) 29. 2月. 1988 (29. 02. 88) パテントファミリーなし	1-2, 13-14 /3-12, 16
X/A	JP, 6-228144, A (大正製薬株式会社) 16. 8月. 1994 (16. 08. 94) パテントファミリーなし	1-2, 13-14 /3-12, 16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27. 07. 99	国際調査報告の発送日 10.08.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印 4N 9637 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

人の治療方法である。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**PTThis Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**